

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

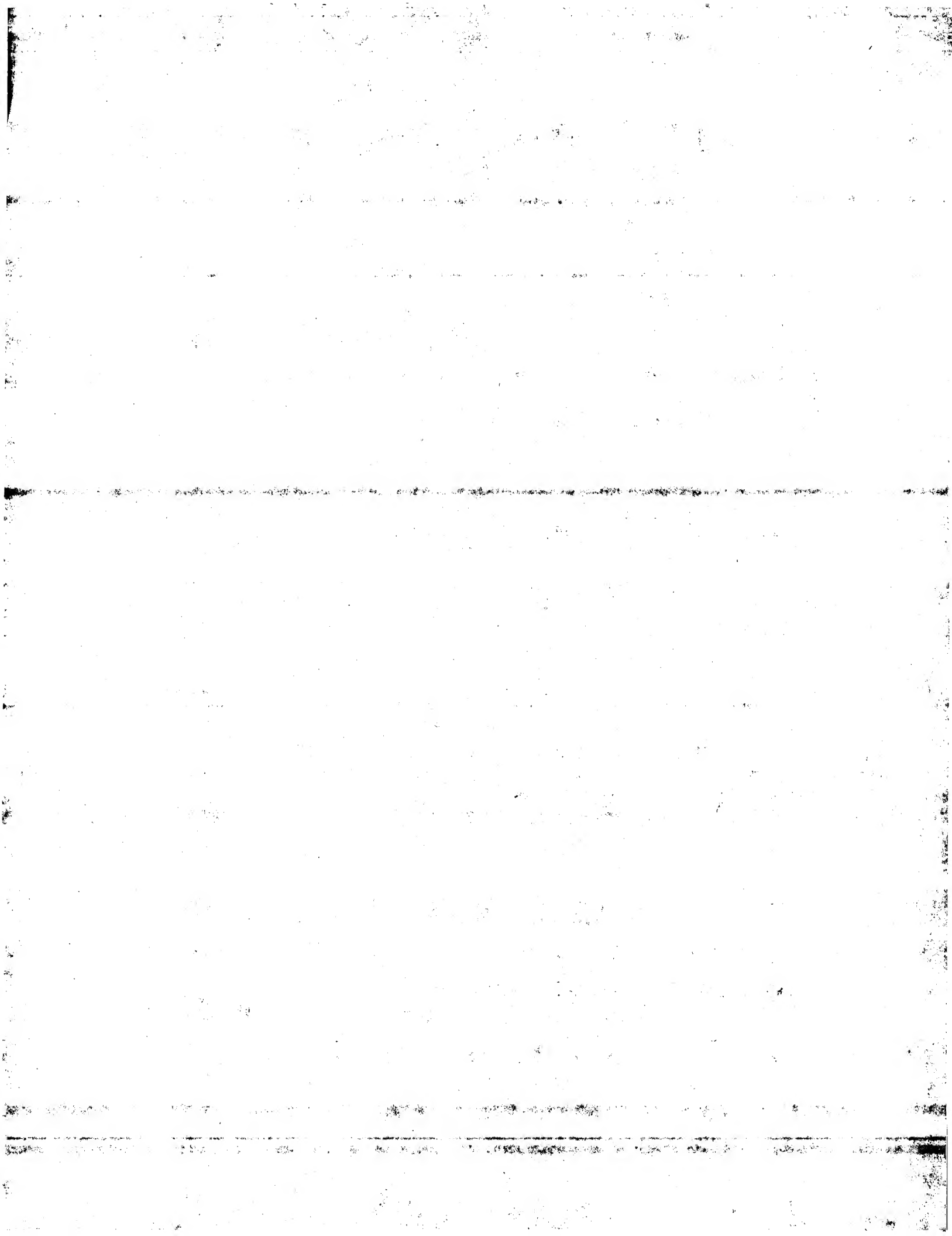
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**





①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 195 49 267 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 195 49 267.6  
㉑ Anmeldetag: 28. 12. 95  
㉒ Offenlegungstag: 3. 7. 97

㉓ Int. Cl. 6:  
**C 07 K 1/30**  
G 01 N 1/28  
G 01 N 33/68  
C 12 Q 1/37  
C 12 Q 1/26  
C 12 N 9/52  
C 12 N 9/68  
C 12 N 9/70  
C 12 N 9/48  
C 12 N 9/02

DE 195 49 267 A 1

㉔ Anmelder:

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,  
13125 Berlin, DE

㉕ Erfinder:

Behlke, Joachim, Prof. Dr., 13125 Berlin, DE;  
Knespel, Andreas, 16341 Neu-Buch, DE

㉖ Verfahren zur Kristallisation von Proteinen

㉗ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kristallisation von Proteinen insbesondere zur Induktion und Früherkennung von Kristallkeimen in Proteinlösungen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß eine hochgesättigte Proteinlösung hochtourig zentrifugiert wird, die Konzentrationsverteilung des Proteins in der Zentrifugenzelle analysiert und die Zentrifugation abgebrochen wird, sobald Assoziate (Kristallkeime) bestimmter Größe und Konzentration vorliegen.

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kristallisation von Proteinen insbesondere zur Induktion und Früherkennung von Kristallkeimen in Proteinlösungen.

Mit Hilfe des "genetic engineering" sind Biochemiker und Molekularbiologen heute in der Lage, viele neue Proteine verfügbar zu machen. Diese können zur Katalyse chemischer Reaktionen in verschiedenen Zweigen der pharmazeutischen und Nahrungsgüter-Industrie erfolgreich eingesetzt werden. Zur Analyse der Makromoleküle wird mit großem Erfolg die Röntgenkristallographie eingesetzt. Diese Methode ist eine der am besten geeigneten, um die dreidimensionale Struktur von Makromolekülen auf atomarer Ebenen zu lösen. Mit dieser Technik können aber auch makromolekulare Wechselwirkungen wie Enzym-Substratbindungen oder Antigen-Antikörperkomplexe "sichtbar" gemacht werden. Die enormen Fortschritte auf dem Gebiet der Hard- und Software-Entwicklung der Röntgenkristallographie haben dazu geführt, daß die Ergebnisse gegenwärtig in wesentlich kürzerer Zeit gewonnen werden können als noch vor ein oder zwei Jahrzehnten. Trotz großer Anstrengungen konnten jedoch in letzter Zeit nicht im gleichen Maße genügend geeignete Kristalle für die hoch auflösende Kristallographie bereitgestellt werden, so daß durch diesen Umstand die Geschwindigkeit des technischen Fortschritts bestimmt wird.

Die Kristallisation biologischer Makromoleküle, ihr gezielter Übergang von der gelösten in die "wohlgeordnete" feste Phase, wird wesentlich durch das Löslichkeitsverhalten bestimmt, das wiederum durch verschiedene Parameter wie Ionenstärke, Ionenart, Temperatur oder bestimmte Zusätze beeinflusst wird, bestimmt. Zu dieser Problematik gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen, die in Reviews (T. L. Blundell, L. N. Johnson, Protein Crystallography, Acad. Press New York 1976; G. Feher, Z. Kam, Meth. Enzymology, 114 (1985); A. McPherson, Eur. J. Biochem. 189, 1—23, (1990)) dokumentiert sind.

Obwohl auch die fundamentalen Vorgänge, die zur Keimbildung als Voraussetzung für die Kristallisation bekannt sind und diese wiederholt im Detail beschrieben wurden, gibt es kein allgemein anwendbares Rezept, mit dem man gezielt Proteinkristalle erhalten kann. So wird noch heute nach empirischen Verfahren mit bestimmten Präzipitationskombinationen (J. Jancarik, S.-H. Kim, J. Appl. Cryst. 24, 409—411, (1991)) versucht, geeignete Proteinkristalle mit z. T. viel Zeitaufwand zu erhalten.

Die Schwierigkeiten bei der Kristallisation von Proteinen liegen neben der oftmals beobachteten hohen Domänenbeweglichkeit vor allem in den komplexen physikalisch-chemischen Eigenschaften, die durch pH, Ionenstärke, Temperatur oder Lösungsmittelzusätze beeinflusst werden und somit zu vielen Mikroheterogenitäten (z. T. auch Denaturierung) führen können (A. McPherson, s. o.).

Trotzdem besitzen identische Proteinpopulationen ein nahezu identisches Ladungsmuster mit einer statistischen Verteilung auf der Moleküloberfläche und sind in der Regel in Lösung monodispers. Der Effekt der Abstoßungskräfte kann durch einen weiteren vorsichtigen Entzug des Lösungsmittels aus konzentrierten (übersättigten) Proteinlösungen scheinbar ausgeglichen werden. Dafür bieten sich verschiedene Methoden wie Mikrodialyse oder "isopiestic Destillation" (hängender oder sitzender Tropfen) an. Diese "Dehydrationsvorgänge" müssen mit einer notwendigen Sorgfalt und möglichst geringer Geschwindigkeit erfolgen, um den Proteinmolekülen die notwendige Zeit zum optimalen Aneinanderlagern mit der Ausbildung einer gemeinsamen Hydrathülle zu ermöglichen. Trotz erhöhter Lösungsmittelviskosität, die durch hinzugefügte Additiva (lyotrope Salze, Polyethylenglykol usw.) erreicht wird, ist auch die diffusionsbedingte Beweglichkeit monomerer Makromoleküle noch verhältnismäßig hoch. Sie nimmt erst bei der Assoziatbildung allmählich ab, so daß ein "Andocken" monomerer Spezies an größere bereits existierende Makromolekülverbände erleichtert wird.

Die geschilderten Vorgänge mit den angedeuteten Schwierigkeiten lassen sich durch ein energetisches Prinzip  $\Delta G_{\text{Kristall}} < \Delta G_{\text{Lösung}}$  beschreiben (R. Boistelle, J. P. Astier, J. Crystal Growth 90, 14—30 (1988)). Dem Übergang von der flüssigen in die feste Phase ist wie bei vielen Reaktionsabläufen eine Aktivierungsenergie vorgelagert. Sie wird wesentlich durch die Abstoßungskräfte zwischen den Proteinmolekülen bestimmt. Mit zunehmender Assoziatgröße nehmen die Anziehungskräfte volumenbedingt gegenüber den Abstoßungskräften zu, so daß die weitere Assoziation zur Keimbildung mit weniger ungünstigerer Energie und schließlich unter Energiefreisetzung abläuft. Diese Erkenntnisse stellen das Grundprinzip der Kristallisation dar. Nach dem Erscheinen stabiler Assoziate (Proteinkeime) kann in absehbarer Zeit in einer "spontanen" Reaktion die Bildung von Kristallen nachgewiesen werden.

Die optimalen Bedingungen bezüglich der Proteinkonzentration, die zur Keimbildung bzw. zum Kristallwachstum führen, differieren erheblich (A. Auersch et al. J. Crystal Growth 110, 201 (1991)). Für die Keimbildung sind möglichst hohe Konzentrationen an Makromolekül erwünscht. Das Kristallwachstum soll bei erheblich geringeren Konzentrationen erfolgen. Viele Proteine sind aus verschiedenen Gründen nicht in der Lage, entsprechende Assoziate (Keime) auszubilden. Die Ausbildung von dimeren, trimeren und weiteren Assoziaten erfordert zu viel ungünstige freie Energie, die das System nicht aufbringen kann. Deshalb ist in solchen Fällen das Gleichgewicht ganz stark in Richtung der monomeren Moleküle verschoben.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß es gegenwärtig nicht möglich ist, eine breite Palette von Proteinen röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen zugänglich zu machen, weil diese Proteine aus verschiedenen Gründen nicht in der Lage sind, entsprechende Assoziate zu bilden, die ein Kristallwachstum initiieren.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, geeignete Kristallisationsbedingungen für schwer kristallisierende Proteine zu schaffen, um die Induktion von Assoziaten (Kristallkeimen) zu initiieren, Assoziate mit niedriger Assoziationszahl zu stabilisieren und die Bildung von Assoziaten frühzeitig zu erkennen.

Die Aufgabe konnte überraschend durch hochtourige Zentrifugation einer hochgesättigten Proteinlösung und Analyse der Konzentrationsverteilung des Proteins in der Zentrifugenzone gelöst werden, wobei die Zentrifugation abgebrochen wird, wenn Assoziate (Kristallkeime) in bestimmter Größe und Konzentration vorliegen.

Diese Ultrazentrifugationsmethode ist gemäß der Erfindung zur Induktion und Früherkennung von Kristall-

keimen in hochgesättigten Proteinlösungen geeignet, indem eine kontinuierliche Erhöhung der Proteinkonzentration bis zur Bildung erster Assoziate erfolgt, die hinsichtlich ihrer Partialkonzentration analysiert werden, woraus die Gleichgewichtskonstanten abgeleitet werden, die freie Energie der Assoziationsvorgänge berechnet und die Zentrifugation abgebrochen wird, sobald die Anlagerung von Monomeren an ein vorhandenes Assoziat Energie freisetzt. Dieser Zustand ist notwendig, damit aus den Keimen Kristalle in einer spontanen Reaktion wachsen. Nach dem Erscheinen stabiler Assoziate wird in absehbarer Zeit (1—2 Tage) die Bildung von Kristallen nachgewiesen.

Gemäß der Erfindung werden gegebenenfalls Substanzen mit schwachen "Linker"-Eigenschaften zugesetzt, die überraschend die Bildung von Proteinassoziaten unterstützend initiieren oder Assoziate mit niedrigen Assoziationszahlen stabilisieren.

Substanzen mit schwachen "Linker"-Eigenschaften sind dadurch charakterisiert, daß sie eine kovalente und mindestens eine Wasserstoffbrücke zu unterschiedlichen Proteinmolekülen ausbilden können.

Bevorzugt handelt es sich um Pyridoxalphosphat oder entsprechende Verbindungen.

Das Verfahren ist anwendbar für Proteine, die auf Grund ihrer erhöhten Flexibilität oder besonders hohen Domänenbeweglichkeit, — wie Fibrinolytika mit "Kringelstrukturen" — nicht zur Ausbildung von Assoziatstrukturen in der Lage sind, insbesondere für Plasminogen, Plasminogen-Aktivatoren, Streptokinase, und Staphylokinase.

Außerdem kann es auch für Membranproteine, die im delipidierten Zustand aggregieren, ansonsten aber "reaktionsträge" Oberflächen besitzen, die in der Regel aber nicht zur Ausbildung einer geordneten Assoziatstruktur befähigt sind — wie Cytochrom P450 — angewendet werden. Cytochrom P450 katalysiert mannigfaltige Oxygenasereaktionen und wird insbesondere zur Steroidhydroxylierung eingesetzt oder ist an der Synthese des Aldosterons (Bluthochdruck) beteiligt.

Es werden erfindungsgemäß die Partialkonzentrationen der einzelnen Molekülspezies (Monomere und Assoziate) von hochkonzentrierten Proteinlösungen in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration, der gewählten Drehzahl und der Zeit analysiert.

Diese Daten erlauben Rückschlüsse über die Größe der Kristallkeime und ihre Stabilität.

Damit hat das Verfahren den großen Vorteil, schwer kristallisierbare Proteine in Lösungen zur Assoziatbildung anzuregen, diese frühzeitig zu erkennen und Assoziate mit niedriger Assoziationszahl zu stabilisieren.

Anschließend wird die Erfindung an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert, die die Erfindung jedoch nicht beschränken soll.

#### Material und Methoden

Die Proteine Lysozym und Papain wurden von Boehringer, Mannheim, bzw. Merck, Darmstadt, erhalten.

Die Zentrifugationsexperimente wurden mit der analytischen Ultrazentrifuge Spinco E (Beckman) unter Verwendung einer Schlierenoptik durchgeführt.

Die Sedimentationskoeffizienten des monomeren Proteins wurden zunächst aus der zeitabhängigen Wanderung der Grenzschicht in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt.

$$s = \frac{\ln(r/r_m)}{\omega^2(t-t_0)} \quad (1)$$

mit  $r$  als Radialposition (entspricht gewöhnlich dem 50% Wert der Grenzschicht) zur Zeit  $t$  und  $r_m$  als Meniskuposition (Zeit  $t_0$ ) und  $\omega$  der Winkelgeschwindigkeit. Bei Verwendung des Schlierenoptischen Systems erhält man für die radiale Konzentrations-Verteilung eine Gaußkurve mit den Ordinaten  $\frac{1}{r}(dc/dr)$ , wobei die Fläche unter der Kurve proportional zur Anfangskonzentration ist.

Für eine monodisperse Lösung, die nur eine Species während der zeit-abhängigen Bewegung des Peaks enthält (50% Fraktion) bestimmt man den Sedimentationskoeffizienten gemäß Formel (1). Wenn die Lösung neben den Monomeren auch noch Oligomere wie Dimere, Trimere, Tetramere ect. enthält, wird die Gaußkurve mehr asymmetrisch wegen der etwas schnelleren Bewegung der assoziierten Spezies. Ihre Sedimentationskoeffizienten  $s_n$  können mit den entsprechenden Parametern  $S_1$  der Monomeren nach C.D. Cox, Arch. Biochem. Biophys. 129 (1969) 106—123 wie folgt abgeschätzt werden.

$$s_n = s_1 \cdot n^{2/3} \quad (2)$$

Die radialen Positionen der einzelnen Fraktionen als Teil der Gesamtkonzentration zur Zeit  $t$  können nach Gleichung (3) berechnet werden.

$$r_n = r_m \cdot e^{s_n \cdot t \cdot \omega^2} \quad (3)$$

Die zurückgelegten Strecken in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen reduzieren sich bedingt durch den Einfluß der Viskosität ( $\eta$ ) und Dichte ( $\zeta$ ) des Lösungsmittels (Gleichung (4)) um den Faktor  $f$ .

$$f = \left( \frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}} \right) \cdot \left( \frac{\eta_{T,soi}}{\eta_{T,w}} \right) \cdot \left( \frac{1 - \rho_{20,w} \cdot \bar{v}_{20,w}}{1 - \rho_{T,soi} \cdot \bar{v}_{T,soi}} \right) \quad (4)$$

Unter den gegebenen Bedingungen mit begrenzter Wanderungstrecke und Drehzahl ist eine Separation oder vollständige Beschreibung aller Partialkonzentrationen durch eine individuelle Gaußkurve nicht möglich. Deshalb wurden die entsprechenden  $dc/dr$  Werte bei  $r_0$  den Partialkonzentrationen gleichgesetzt und durch Division durch die molekulare Masse die molaren Partialkonzentrationen gewonnen. Aus den Partialkonzentrationen wurden die Assoziationskonstanten berechnet.

$$K_n = \frac{(c_n)}{(c_{n-1}) \cdot (c_1)} \quad (5)$$

mit  $n = 2, 3, 4 \dots$  für die Dimerisationsreaktion ( $K_2$ ), die Assoziation eines Monomeren an ein Dimeres zum Trimeren ( $K_3$ ), und von einem weiteren Monomeren zum Tetramer ( $K_4$ ) etc. Aus den  $K_n$ -Daten kann der Wert der freien Energie ( $\Delta G$ ) für die verschiedenen Assoziationsschritte bestimmt werden.

$$\Delta G_n = RT \ln K_n \quad (6)$$

Die Änderung der freien Energie  $\Delta(\Delta G)$  für die Anlagerung von Monomeren an schon vorhandene Assoziate liefert unterschiedliche Werte. Die einzelnen Schritte sind für kleine und mittlere Assoziate durch positive oder ungünstige freie Energie gekennzeichnet. Assoziate mit mehr als 12 Monomeren sind energetisch begünstigt und geben bei weiterer Anlagerung von Monomeren Energie ab.

#### Ergebnisse

Gereinigtes Hühnerei-Lysozym (20 mg/ml) oder Papain (30 mg/ml) wurden in 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,7, mit 5% NaCl oder in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 1 M  $(NH_4)_2SO_4$  gelöst. 300 ml der Proteinlösung, die durch Filtration von Aggregaten befreit wurde, wurden in einer Doppelsektorzelle und bei 40 000 rpm bei Raumtemperatur ungefähr eine Stunde zentrifugiert. Während dieser Zeit hat die Konzentration der Grenzschicht eine Gaußähnliche Kurve angenommen. Unter Berücksichtigung der Korrektur für Viskosität und Dichte der Lösungsmittel (4) sedimentiert die Grenzschicht schneller als für monomere Proteine beobachtet ( $s_1 = 1.7$  (S) für Lysozym oder 2.35 (S) für Papain) mit Werten, die charakteristisch sind für Oligomere Species  $s_n$  wie von (2) hergeleitet.

Die Partialkonzentrationen  $c_n/c_0$  ( $n = 1, 2, 3, 4 \dots$ ) wurden als  $dc/dr$  oder ordinatenwerte von der experimentellen Kurve bei  $r_0$  gemäß (3) gemessen. Sie sind für ein Lysozym Experiment gegen die Assoziationszahl  $n$  aufgetragen. Abb. 1 stellt eine molare Konzentrationsverteilung von unterschiedlichen Lysozym-Oligomeren eines Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiments nach ungefähr 35 min dar.

Man sieht vorwiegend Monomere und eine stetig abnehmende Konzentration von Oligomeren steigender Größe. Diese Werte wurden für die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten für die Assoziation und zur Abschätzung der freien Energie  $\Delta G = -RT \ln K$  für diesen Prozeß gemäß den Gleichungen (5) und (6) verwendet. Im Vergleich zur Dimerisierungsreaktion sind die nachfolgenden Assoziationsschritte durch positive oder ungünstige freie Energie gekennzeichnet. Für Oligomere größer als ein Dodekamer ändert sich das Vorzeichen. Die Assoziate geben dann bei der Aufnahme von Monomeren Energie frei.

#### Legende zu Abb. 1

Darstellung der molaren Partialkonzentrationen ( $\square$ ) von monomeren und oligomeren Lysozymspezies abhängig von der Assoziationszahl. Die Daten wurden aus einem Sedimentationsexperiment bei 40 000 rpm nach 35 Minuten erhalten. Die Änderungen der freien Energie ( $\Delta(\Delta G)$ ) für die Assoziationsschritte ( $\circ$ ) beziehen sich auf den Vergleich zur Dimerisierungsreaktion.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Kristallisation von Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß eine hochgesättigte Proteinlösung hochtourig zentrifugiert wird, die Konzentrationsverteilung des Proteins in der Zentrifugenzone analysiert und die Zentrifugation abgebrochen wird, sobald Assoziate (Kristallkeime) bestimmter Größe und Konzentration vorliegen.

2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Induktion und Früherkennung von Kristallkeimen in Proteinlösungen mittels analytischer Ultrazentrifugation durch kontinuierliche Erhöhung der Proteinkonzentration bis zur Bildung erster Assoziate, die hinsichtlich ihrer Partialkonzentration analysiert werden, woraus die Gleichgewichtskonstanten abgeleitet werden und die freie Energie der Assoziationsvorgänge berechnet und die Zentrifugation abgebrochen wird, sobald die Anlagerung von Monomeren an ein vorhandenes Assoziat Energie freisetzt (spontane Reaktion).

3. Verfahren nach Anspruch 1 + 2 zur Stabilisierung von Kristallkeimen, dadurch gekennzeichnet, daß Substanzen, die schwache "Linker"-Eigenschaften aufweisen, zugesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Pyridoxalphosphat zugesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß es für Fibrinolytika angewendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es für Plasminogen, Plasminogen-Aktivatoren, Streptokinase, Staphylokinase angewendet wird. 5
7. Verfahren nach Anspruch 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß es für Membranproteine angewendet wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es für Cytochrom P450 angewendet wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Abb. 1

